

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

ARHEJE – PORIJEKLO, EVOLUCIJA I EKOLOGIJA

THE ARCHAEA – ORIGIN, EVOLUTION AND ECOLOGY

SEMINARSKI RAD

Vesna Vetma

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc.dr.sc. Martina Šeruga Musić

Zagreb, 2012

Sadržaj

1.UVOD.....	1
2. PORIJEKLO SUPERKRALJEVSTVA	2
2.1. TEORIJE O POSTANKU ARHEJA.....	3
3. TAKSONOMIJA ARHEJA.....	5
4. KOMPARATIVNA GENETIKA ARHEJA, BAKTERIJA I EUKARIOTA	7
4.1. REPLIKACIJA	7
4.2. TRANSKRIPCIJA.....	8
4.3. TRANSLACIJA.....	8
5. OSTALE KARAKTERISTIKE ARHEJA	9
5.1. MEMBRANA I POVRŠINSKE STRUKTURE.....	9
5.2. METABOLIZAM	11
5.3. TERMOSTABILNOST	13
6. EKOLOGIJA ARHEJA	14
6.1. KOLJENO CRENOARCHAEOTA	14
6.2. KOLJENO EURYARCHAEOTA	17
6.2.1. METANOGENI	17
6.2.2. HALOBACTERIA	18
6.2.3. THERMOPLASMATA.....	20
6.2.4. SUMPOR–REDUCIRAJUĆI EKSTREMNI TERMOFILI.....	21
6.2.5. SULFAT – REDUCIRAJUĆI EURYARCHAEOTA	21
7. ZAKLJUČAK	22
8. LITERATURA.....	24
9.SAŽETAK.....	25
10.SUMMARY.....	25

1.UVOD

Sve do nedavno, arheje nisu bile prepoznate kao zasebna domena živog svijeta. Do dvadesetog stoljeća, sva živa bića bila su podijeljena ili na biljke ili na životinje. U 1950.-ima i 1960.-ima biolozi dolaze do uviđaja da u svoju klasifikaciju nisu uvrstili gljive, protiste i bakterije. Sedamdesetih godina prošlog stoljeća sustav pet kraljevstava je bio prihvaćen kao model po kojem su se klasificirala živa bića. Također, napravljena je i razlika između prokariotskih bakterija i četiri eukariotska kraljevstva (biljke, životinje, gljive i protisti) (<http://en.wikipedia.org/>). U kasnim sedamdesetima dolazi do velikog otkrića, jedne sasvim drugačije i nove skupine organizama – arheja. Dr. Carl Woese sa Sveučilišta Illinois istraživao je veze između prokariota na temelju specifične sekvence RNA i otkrio da postoje dvije potpuno odvojene skupine unutar prokariota. Te „bakterije“ su se bitno razlikovale i od eukariota i prokariota. Zbog te razlike Woese je predložio da se živi svijet dijeli na tri domene: Eukaryota, Eubacteria i Archaea.

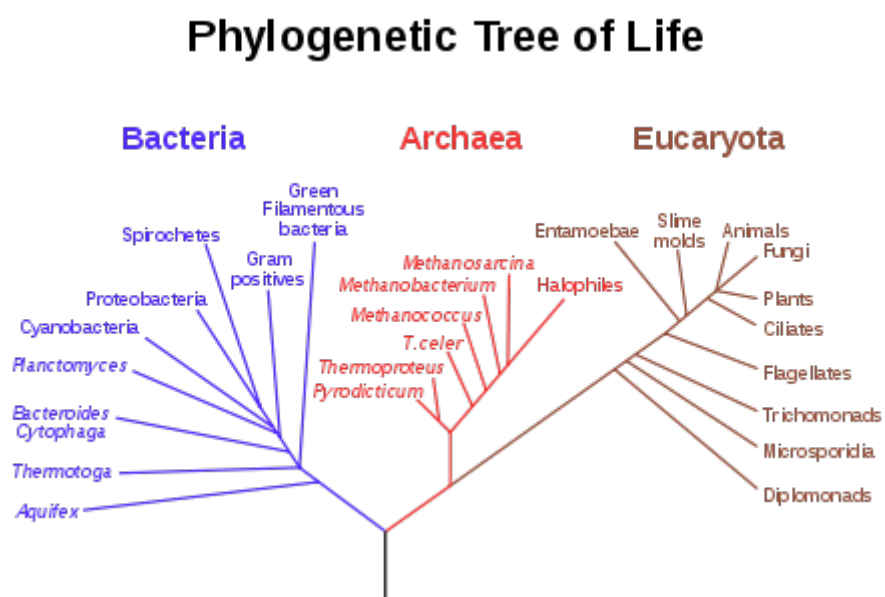
Svrstavanje arheja u treću domenu života temeljeno na analizama proteina i 16S rRNA potvrđeno je komparativnom genomikom. Brojne komponente arhealnih molekularnih mehanizama i informacijskih procesa su sličniji eukariotskim nego bakterijskim, a nekad su unikatni za arheje i eukariote. Geni koji kodiraju za proteine uključene u replikaciju, transkripciju i translaciju su homologni eukariotskima, dok su geni uključeni u metabolizam slični bakterijskima. Također, ono što definira arheje osim sličnosti s bakterijama i eukariotima su i unikatne arhealne strukture kao npr. stereokemija glicerolne okosnice membranskih fosfolipida. Bez iznimke, svi arhealni membranski fosfolipidi su izoprenoidni eteri građeni na okosnici glicerol-1-fosfata dok su sve bakterijske i eukariotske membrane građene od esterski povezanih masnih kiselina na okosnici glicerol-3-fosfata (Wiley i sur.2011).

Domena arheja sadrži tri kraljevstva: Crenarchaeota, Euryarchaeota i Korarchaeota. Duboko ukorijenjena pozicija u univerzalnom stablu života ukazuje na činjenicu da su arheje najbliži poznati srodnici originalnih prokariotskih organizama iz kojih je nastao život. Ova filogenetska pozicija čini arheje važnim organizmima za izučavanje evolucije, geokemije i mikrobne ekologije rane Zemlje, a možda i planeta. U početku se mislilo da kraljevstvo Crenarchaeota sadrži samo termofilne, sumpor-reducirajuće arheje, ali pronalazak arheja u površinskim vodama oceana ukazuje na to da je kraljevstvo puno raznolikije nego se mislilo.

Kraljevstvo Euryarchaeota obuhvaća metanogene arheje, ekstremne halofile i ekstremne termofile. Najnovije kraljevstvo, Korarchaeota, obuhvaća arheje nađene u hidrotermalnim izvorima.

2. PORIJEKLO SUPERKRALJEVSTVA

Točno porijeklo superkraljevstva nije još utvrđeno, ali postoje razne teorije o tome. Možda je najprihvaćenija ona teorija koja objedinjuje radove znanstvenika Lake, Gupta i Cavalier – Smith (Slika 1). Po toj sintetskoj teoriji kombinacija antibiotskog „ratovanja“ i virusne endosimbioze u bacilu je dovela do dramatične promjene u bakteriji koja je dovela do rođenja arheja i bakterija (Valas i Bourne 2011).



Slika 1. Uvriježeni način prikazivanja filogenetskog stabla života prema prihvaćenoj sintetskoj teoriji (en.wikipedia.org)

2.1. TEORIJE O POSTANKU ARHEJA

Radhey Gupta je napravio detaljno stablo života upotrebljavajući rijetko fiksirane insercije – delecije (*indels*) u prokariotskoj grupi (Gupta 1998). Zaključio je da je korijen stabla života negdje unutar Gram–pozitivnih bakterija, a arheje postavlja kao izvedenice iz koljena *Firmicutes*. Glavna sila u njegovoj teoriji je antibiotski rat. Diskutira o razlikama arheja i bakterija koje se temelje na metama antibiotika koje proizvodi Gram-pozitivna bakterija. Njegov recentni rad pokazuje da mnoga mjesta za vezanje antibiotika imaju dramatično različite afinitete u superkraljevstvima. Snaga Guptine teorije leži u činjenici da su mnoge grane filogenetskog stabla snažno poduprte s nekoliko neovisnih indela. Ono u čemu se drugi znanstvenici ne slažu s Guptinim radom je polarizacija proteina Hsp70 koji je upotrebljen za opravdanje korijena stabla života. Antibiotski rat je snažna evolucijska sila, ali u Guptinoj hipotezi se čini da je bila neka posebna „bitka“ koja je rezultirala nastankom arheja. On ne objašnjava zašto je antibiotski rat rezultirao u samo jednom drugačijem prokariotskom superkraljevstvu. Zar ne bi očekivali da bi postojalo više modificiranih ribosoma kao odgovor na antibiotski pritisak? Antibiotski rat nije dovoljan sam po sebi da objasni velike razlike između prokariotskih superkraljevstava, ali je sigurno jako važan (Valas i Bourne 2011).

James Lake je također konstruirao detaljno stablo života upotrebljavajući *indels*-e. Njegov rad je više fokusiran na *indels*-e koji mogu biti polarizirani upotrebljavajući paralogue vanjske grupe (Lake i sur. 2008). Snaga Lakeove metode je u tome što daje dokaz za izvedene i ancestralne grupe što je važno za razumijevanje evolucijske povijesti. Polarizacije su većinom neovisne što dopušta pročišćavanje stabla jer pogrešne polarizacije zahvaćaju samo jedan dio stabla. Kao i kod Gupte, korijen stabla leži u firmicutima i daje nekoliko neovisnih razloga zašto to ima smisla. Lake također pretpostavlja da eukarioti imaju krenarhealno porijeklo temeljeno na zajedničkim indelima u EF – 1 i sličnostima u njihovoj ribosomskoj strukturi. Po drugim znanstvenicima ova teorija je dobra, ali treba nadopunjavanje s još podataka. (Valas i Bourne 2011.).

Cavalier – Smith je također postavio teoriju o odnosima i porijeklu superkraljevstva. Glavna razlika između njegove hipoteze i Guptine i Lakeove je u tome što je on postavio korijen u Gram–negativnim bakterijama. On ukorijenjuje arheje unutar ili do koljena Actinobacteria. Cavalier – Smith je konstruirao svoje stablo polarizirajući razne vrste

podataka kao npr. *indel*-e, strukture membrana i kvatenarne strukture. On zaključuje da ne postoji fosil koji ukazuje da su arheje starije od eukariota unatoč mnogim dokazima da su bakterije starije od eukariota. Njegova hipoteza se oslanja na pretpostavku da su arheje holofiletske što bi značilo da su eukarioti njihove „sestre“, a ne potomci. Korijen za neomura (njegov naziv za arheje, eukariote i njihovog zadnjeg zajedničko pretka – LAECA) je u koljenu *Actinobacteria*. On se poziva na zajedničke značajke eukariota i aktinobakterija, ali one su relevante samo ako su arheje holofiletske. Alternativno objašnjenje bi možda bilo moguće – aktinobakterijski endosimbiont blizu korijena eukariota. Cavalier – Smith predlaže da je termofilija glavna pokretačka sila koja je dovela do evolucije *neomura*. Znanstvenici se slažu da ova teorije nije dobra zbog istog razloga kao i Guptina – nije dovoljno selektivno jaka da stvori novo superkraljevstvo. (Valas i Bourne 2011.).

Niti jedan od ovih scenarija ne objašnjava porijeklo mašinerije za replikaciju DNA koja je zajednička arhejama i eukariotima. Patrick Forterre predlaže teorije po kojoj su stanice dobile mogućnost repliciranja DNA od virusa. On predviđa da se to dogodilo tri puta, a svaki događaj je rezultirao porijeklom superkraljevstva. Varijacije u replikaciji DNA pronađene u virosferi su snažna potpora ovoj teoriji. Sve stanice upotrebljavaju dvolančanu DNA, ali virusi mogu imati i razne druge vrste genetičkog materijala. Plastičnost replikacije u virusnom svijetu je mogla dovesti do raznih promjena u staničnom svijetu. (Valas i Bourne 2011).

Istraživanje porijekla arheja je jedna od najatraktivnijih i najaktivnijih područja mikrobiologije.

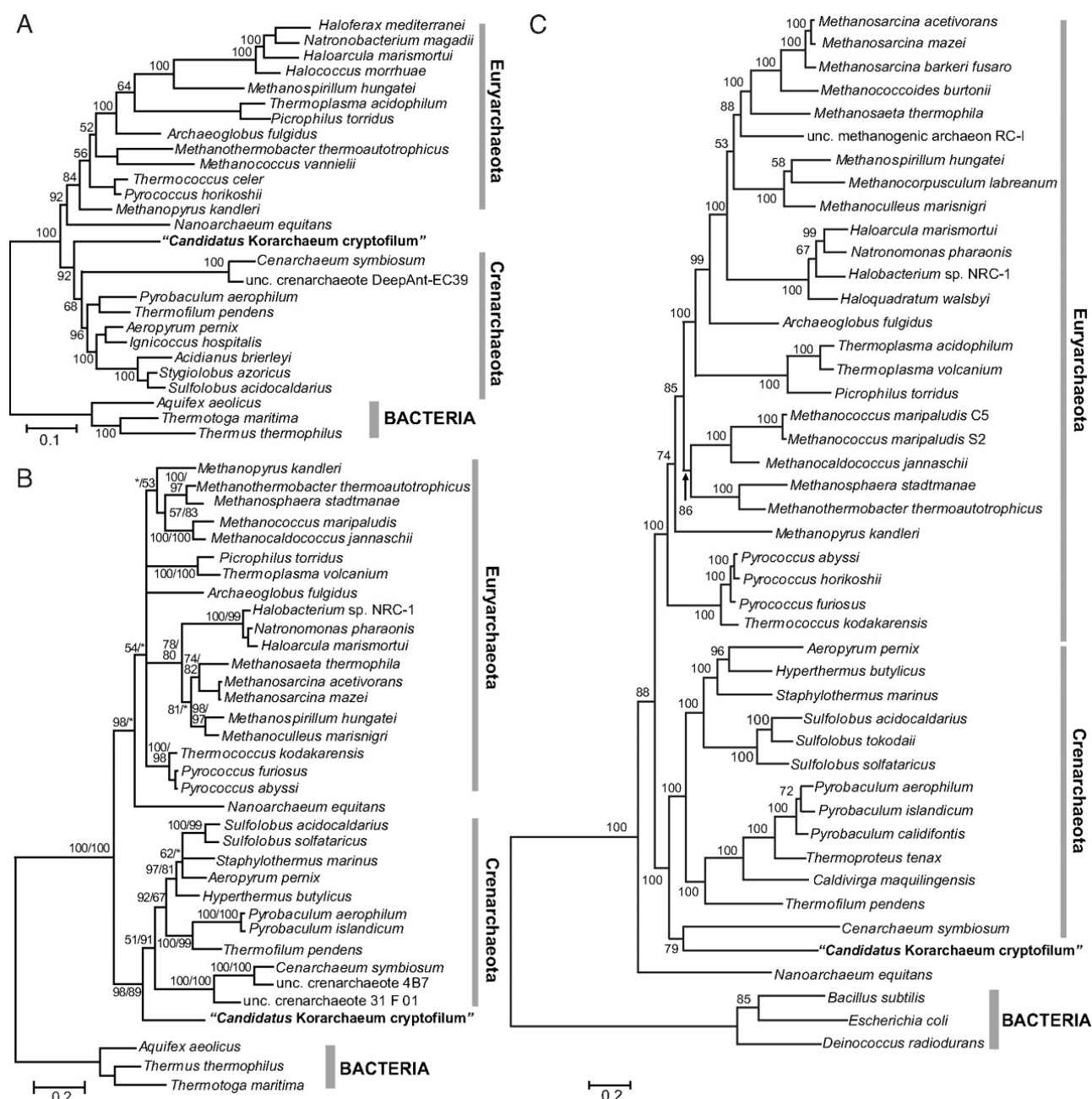
3. TAKSONOMIJA ARHEJA

Arheje možemo podijeliti na 5 velikih grupa po njihovim fiziološkim i morfološkim razlikama: metanogene arheje, arheje koje reduciraju sumpor, ekstremno halofilne arheje, arheje bez stanične stijenke i ekstremno termofilne sumpor metabolizirajuće arheje (Wiley i sur. 2011).

Analize 16S rRNA nukleotidnih sekvenci nam govore da je arhealna filogenija puno kompliciranija. Metagenomičke analize su otkrile mnoge mezofilne i psihrofilne arheje. Ove arhealne sekvence su u početku svrstane u dvije grupe: grupa I je poznata kao mezofilni Crenarchaeota što ih razlikuje od ostalih termofilnih Crenarchaeota i grupa II u kojoj su članovi Euryarchaeota (Slika 2).

Bilo je poteškoća oko razrješenja filogenije grupe I, prvenstveno zbog toga što 16S rRNA sekvence iz hipertermofila imaju puno veći udio G+C od mezofila. Veliki udio G+C stvara artefakte tijekom rekonstrukcije filogenetskog stabla. Rješenje je došlo kada je sekvenciran genom vrste grupe I, *Crenarchaeum symbiosum*. Tada je bilo moguće usporediti slijed aminokiselina svih ribosomskih proteina s slijedovima iz 48 tada sekvenciranih arheja. Filogenetsko stablo ukazuje da su mezofilne arheje odvojeno koljeno, Thaumarchaeota (grč. thaumas – čudo). To implicira da su mezofili možda divergirali prije specijacije Euryarchaeota i termofilnih Crenarchaeota. Pripadnici koljena *Thaumarchaeota* su pod budnim okom istraživača jer je otkriveno da neki od njih vrše aerobnu oksidaciju amonijaka, ključnog koraka u ciklusu fiksacije dušika za kojeg se mislilo da je ograničen na proteobakterije. Nedavno je uvedeno još jedno koljeno *Korarchaeota* koje sadrži malu skupinu termofilnih vrsta koje dijele značajke i s Euryarchaeota i Crenarchaeota, ali je srodnije s Crenarchaeota. Također, ovi podaci upućuju na to da *Nanoarchaeum equitans* ima svoje vlastito koljeno – *Nanoarchaeota*. Vrsta *Caldichaeum subterraneum* ima status kandidata za proglašenje još jednog koljena arheja – *Aigarchaeota* (Wiley i sur. 2011).

Arheje dijelimo u pet koljena: Euryarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota, Nanoarchaeota i Thaumarchaeota.



Slika 2. Prvotna taksonomija arheja. Podijeljenost kraljevstva na Euryarchaeota i Crenarchaeota, a kasnija utvrđena koljena su u statusu *Candidatus* (Valas i sur. 2011)

4. KOMPARATIVNA GENETIKA ARHEJA, BAKTERIJA I EUKARIOTA

Neke osobine arhealne genetike su slične bakterijskim svojstvima, a neke su slične eukariotskim svojstvima. Kao i većina bakterija, arheje imaju cirkularni genom, a dosta njih ima i plazmide. Neke arheje posjeduju proteine slične eukariotskim histonima koji se ne pojavljuju u bakterija. Također, u nekih arheja nalazimo i samo-izrezujuće introne.

4.1. REPLIKACIJA

Arhealna DNA replikacija je mješavina eukariotskih i bakterijskih specifičnosti. Kao kod bakterija, replikacija je dvosmjerna i kreće s A-T bogatog izvorišta replikacije. Iznimka je rod *Sulfolobus* koji ima dva izvorišta. Proteini uključeni u replikaciju su slični eukariotskim proteinima. Nađeni su geni koji kodiraju za inicijacijske proteine slične eukariotskima Cdc6/Orc1. Ti proteini vežu specifične DNA sljedove tzv. *Origin recognition boxes*. Zatim se helikaza MCM slična eukariotskoj veže na tu regiju i odmota dvolančanu uzvojnici DNA i replikacija može započeti. Razdvojene lance DNA stabiliziraju single-stranded binding (SSB) proteini. Neki arhealni SSB proteini nalikuju eukariotskim RPA proteinima (*replication protein A*), a neki nalikuju bakterijskim SSB proteinima (Wiley i sur. 2011). Nakon što započne replikacija, slijedi sinteza DNA. Sve DNA-polimeraze sadrže hvataljku koja povećava procesivnost. U bakterije *Escherichia colicoli* je to B-hvataljka, u eukariota je to PCNA-hvataljka(*proliferative cell nuclear antigen*). Sve arheje imaju PCNA-hvataljku. Termostabilnost arhealno-eukariotskih proteina proizlazi iz jakih ionskih sparivanja unutar samih proteina što dovodi do povećanih elektrostatskih interakcija koji preveniraju denaturaciju.

Sve arheje imaju eukariotsku B-obitelj DNA-polimeraza, ali za replikaciju trebaju i svoju vlastitu specifičnu polimerazu PolD. B-polimeraza provjerava točkaste mutacije koje su se dogodile i popravljaju ih (služi kao uracil-N-glikozilaza kod bakterija).

Ne zna se mnogo o diobi stanice u arheja (Wiley i sur. 2011).

4.2. TRANSKRIPCIJA

Transkripcija u arheja je fina mješavina bakterijskih i eukariotskih specifičnosti. Arhealna RNA-polimeraza sliči eukariotskim RNA-polimerazama I i III i sastoji se od 10 podjedinica. Kao i eukariotske RNA-polimeraze, arhealne također ne prepoznaju promotorsku regiju bez pomoćnih proteina TBP (*TATA-box binding protein*) i tfB (transkripcijski faktor B). Arhealni promotori su slični eukariotskim promotorima. Sadrže *TATA-box* i regiju bogatu purinima - *B responsive element (BRE)*. U eukariota na *BRE*- sekvencu veže se transkripcijski faktor IIB dok kod arheja, vezanje TFB i TBP na *BRE*-regiju daje signal za slaganje RNA-polimeraze i početak transkripcije. Za razliku, regulacija transkripcije je sličnija bakterijskoj regulaciji nego eukariotskoj.

4.3. TRANSLACIJA

Iako arheje posjeduju 70S ribosome, translacija je neosjetljiva na antibiotike kloramfenikol i kanamicin koji djeluju na bakterijske 70S ribosome. Arheje su osjetljive na eukariotski inhibitor anizomicin. U arheja je otkriveno 6 faktora inicijacije translacije, 2 elongacijska faktora i 1 otpuštajući faktor. Kao i eukariotski EF-2, i arhealni posjeduje modificirani histidinski ostatak koji je ADP-riboziliran toksinom difterije. Također, arhealna inicirajuća tRNA nosi metionin. Za razliku od bakterija i eukariota, T ψ C ruka arhealne tRNA ne sadrži timin nego pseudouridin ili 1 - metilpseudouridin. Najzanimljivija je inkorporacija 21. aminokiseline selenocistein u dvije specifične regije mRNA. Selenocistein se sintetizira iz serina tako da enzim selenocistein-sintaza modificira serin koji je vezan na tRNA. Aminokiselinu prepoznaje specifični elongacijski faktor SelB, a ugrađuje se na mjesto UGA-stop kodona kod bakterija, a kod eukariota i arheja ugrađuje se u 3'UTR-regiju.

Pirolizin, 22. aminokiselina, je pronađena u metanogenih arheja i u jednoj bakteriji. Ugrađuje se umjesto UAG-stop kodona i u sekvencu *PYLIS (pyrrolysine insertion sequence)* koja radi petlju i tako prevenira terminaciju translacije i ugrađuje rijetku aminokiselinu. Pirolizin ima svoju vlastitu tRNA tj. sintetizira se prije nego se doda na tRNA (Wiley i sur. 2011).

5. OSTALE KARAKTERISTIKE ARHEJA

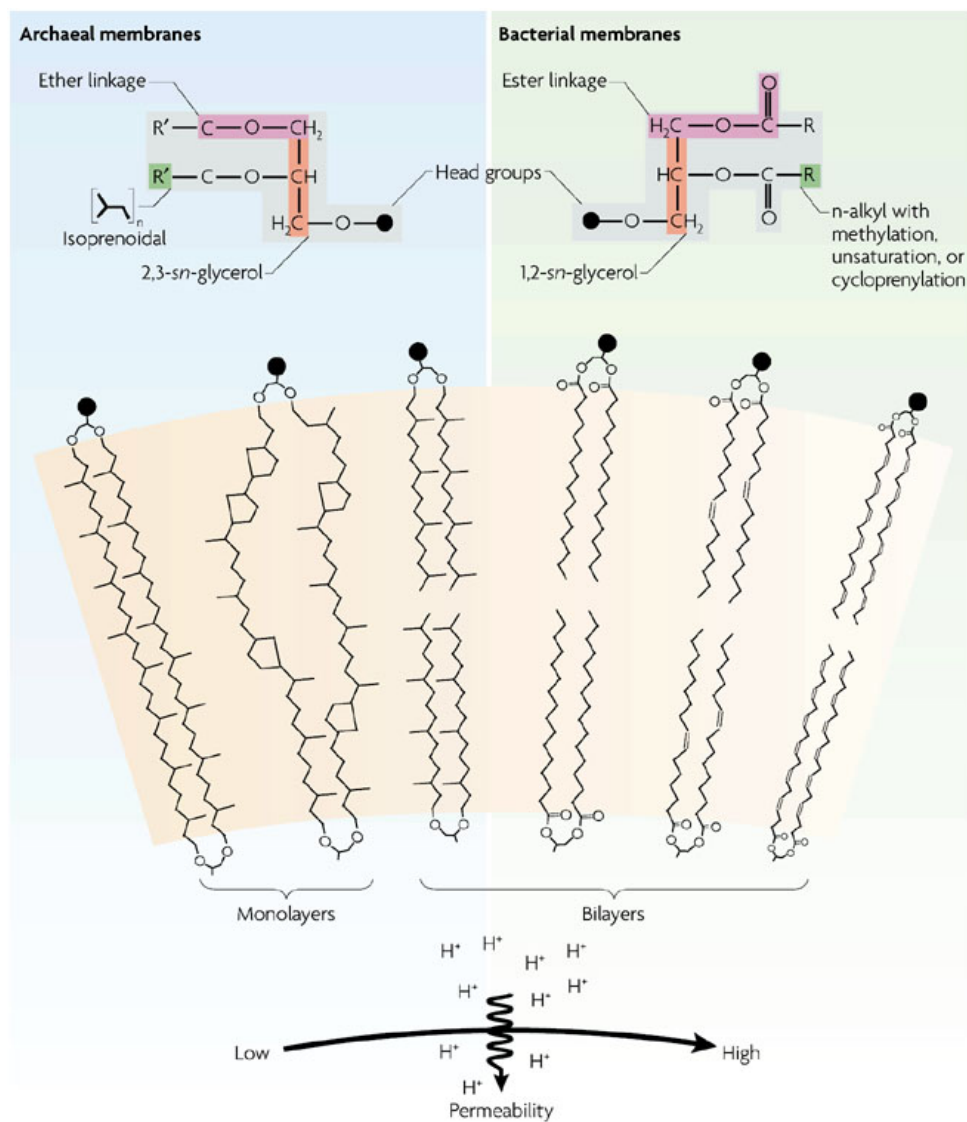
5.1. MEMBRANA I POVRŠINSKE STRUKTURE

Arhealna stanična stijenka se bitno razlikuje od one u bakterija. Sve bakterije, osim razreda *Mollicutes* koje nemaju staničnu stijenku, posjeduju staničnu stijenku građenu od peptidoglikana i na temelju toga bakterije dijelimo na Gram-pozitivne i Gram-negativne. Arheje ne možemo tako dijeliti.

Metanogene arheje iz koljena Euryarchaeota imaju staničnu stijenku građenu od pseudomureina. Pseudomurein je polimer sličan peptidoglikanu i međustobno je povezan L-aminokiselinama. Pripadnici roda *Methanosarcina* sadrže kompleksni polisaharid sličan hondroin-sulfatu koji gradi vezivno tkivo životinja. Neki metanogene arheje imaju proteinsku ovojnica, dok pripadnici roda *Ignicoccus* jedini imaju vanjsku membranu (Wiley i sur. 2011).

Jedna od karakteristika arheja je posebna građa membrane koja se razlikuje i od eukariota i od prokariota. Kod arheja ugljikovodici su vezani za glicerol eterskom vezom. Stereokemija lipida se također razlikuje. Arheje sintetiziraju C₂₀ lanac dieterskih lipida koji se povezuje u dvostruku membranu, a nekada su dva glicerola povezana i tvore duge tetraetere od 40 ugljikovih atoma. Stanice mogu prilagođavati duljinu membrane tako da cikliziraju lanac da tvori ciklobutanske prstene. Ciklobutanski prsteni se gušće pakiraju što membranu čini stabilnijom na višim temperaturama. Tetraeterske membrane su nepropusnije za ione od dieterskih što prevenira gubitak iona. Membrana još sadrži polarne fosfolipide, sulfolipide i glikolipide.

U ne-termofilnih pripadnika koljena Crenoearchaeota pronađena je membrana koja sadrži lipide s ciklopentanskim prstenima nazvana *crenarchaeol*. *Crenarchaeol* je pronađen samo u toj grupi organizama i koristi se kao biomarker za Crenoearchaeota morske planktone.



Nature Reviews | Microbiology

Slika 4. Usporedba građe membrane kod bakterija i arheja te šest vrsta različitih lanaca masnih kiselina kod arheja (Wiley i sur. 2011).

5.2. METABOLIZAM

Zbog velike raznolikosti arheja i staništa koja nastanjuju, metabolizam varira od grupe do grupe. Neke arheje su heterotrofne, neke su autotrofne, a postoje i fototrofne s pigmentom rodopsinom.

Najbolje je istražen metabolizam ugljikohidrata. Tri metabolička puta su definirana u arheja: modificirani Embden–Meyerhof put i dvije varijacije Entner–Doudoroff puta (Slika 3) (Wiley i sur. 2011).

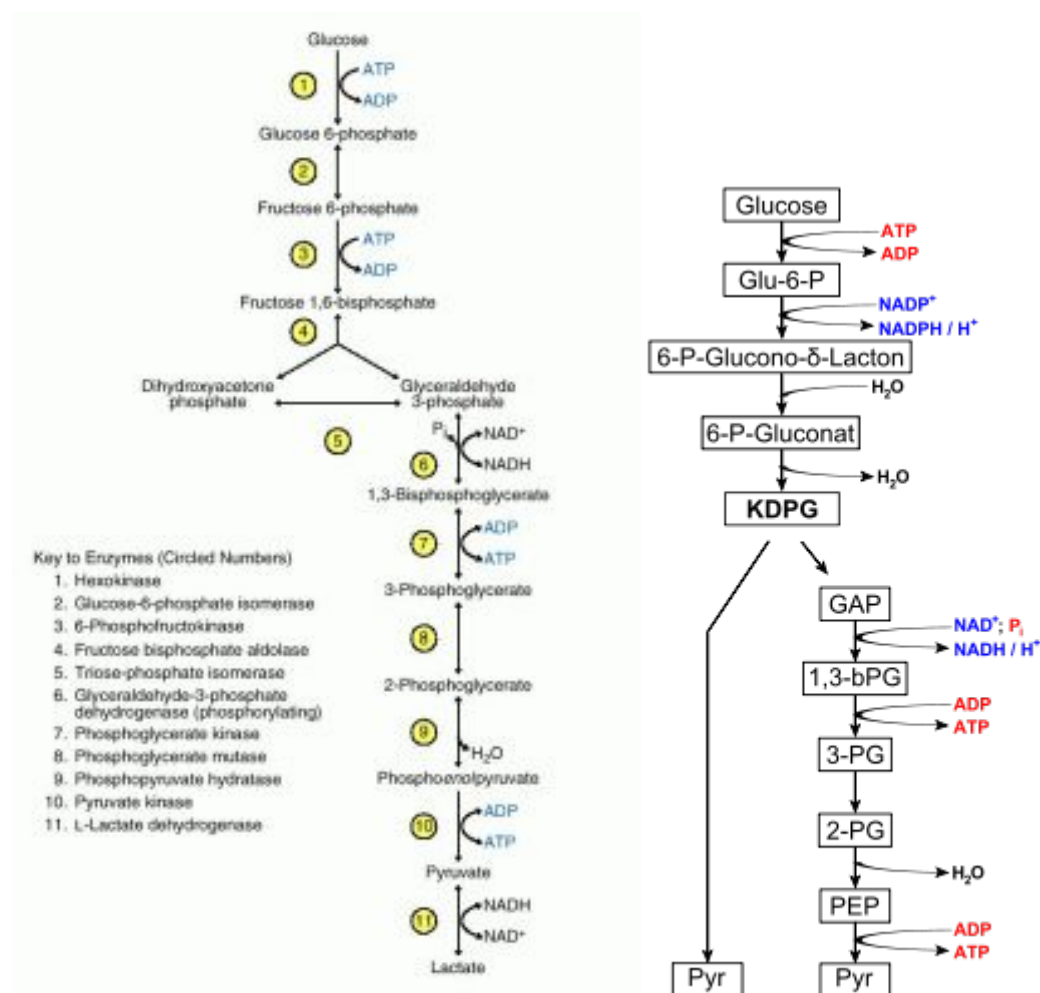
Kod modificiranog EM-puta hipertermofilni Euryarcheota koriste neke nove enzime poput ADP–ovisne glukokinaze i fosfofruktokinaze. Ove kinaze proizvode ADP i za razliku od klasičnog EM puta nema neto proizvodnje ATP–a. Još jedna karakteristika modificiranog EM puta je direktna pretvorba gliceraldehid–3–fosfata direktno u 3–fosfoglicerat s feredoksinom kao kofaktorom, a ne NAD⁺.

Ekstremni halofili i rod *Thermoproteus* kataboliziraju glukozu uz pomoć fosforilativne forme Entner–Duroff puta (ED; slika 3). Glukoza je oksidirana u glukonat pa dehidrirana u 2–keto–3–deoksi–glukonat (KDG). KDG se fosforilira uz utrošak ATP–a. Put dalje ide kao i kod bakterija.

Druga, nefosforilativna verzija ED-puta je pronađena u vrstama rodova *Sulfolobus*, *Thermoplasma* i *Thermoproteus*. Put počinje kao i kod halofila, ali KDG se cijepa uz pomoć KDG–aldolaze na piruvat i gliceraldehid. Gliceraldehid je tada oksidiran u glicerat pa fosforiliran u 2–fosfoglicerat. Piruvat se dalje proizvodi klasičnim ED–putem. Pošto se preskače korak gdje 1,3–bisfosfoglicerat prelazi u 3–fosfoglicerat, nema proizvodnje ATP –a. Sve arheje mogu oksidirati piruvat u acetil– CoA. Ne posjeduju piruvat–dehidrogenazu kao bakterije i eukarioti nego imaju enzim piruvat–oksidoreduktazu. Halofili i ekstremni termofili imaju normalan ciklus limunske kiseline. Metanogeni ne kataboliziraju glukozu pa zato i nemaju kompletan ciklus limunske kiseline.

Malo se zna o detaljima biosintetskih puteva u arheja. Dokazano je da su putevi sinteze aminokiselina, purina i primidina slični kao kod ostalih organizama. Neki metanogeni mogu fiksirati atmosferski dušik, a halofili i metanogeni sintetiziraju glukozu glukoneogenezom. Neki metanogeni i ekstremni termofili imaju glikogen kao rezervnu tvar.

Autotrofija je raširena među metanogenima i ekstremnim termofilima te se fiksacija CO_2 odvija na više načina. Pripadnici roda *Thermoproteus* inkorporiraju CO_2 preko reduktivnog ciklusa limunske kiseline. Ovaj put je prisutan u zelenim sumpornim bakterijama i nekim proteobakterijama. Metanogene arheje i većina termofila inkorporira CO_2 reduktivnim putem preko acetil – CoA. Takav put je prisutan u acetogenih bakterijama i autotrofnih sulfat – reducirajućih bakterija. Nedavno su otkrivena dva nova puta fiksacije CO_2 u Crenoarchaeota. Članovi roda *Sulfobales* koriste ciklus 3–hidroksipropionat/4–hidroksibutirat dok anaerobni rod *Ignicoccus* koristi ciklus dikarboksilat/ 4 – hidroksibutirat. U obje verzije ciklusa acetil – CoA i dvije molekule CO_2 tvore molekulu suksinil – CoA, iako svaki ciklus koristi svoje specifične enzime.



Slika 3. Embden–Meyerhof put i Entner–Doudoroff put (en.wikipedia.org)

5.3. TERMOSTABILNOST

Arheje koje rastu na vrlo visokim temperaturama imaju posebne strategije za čuvanje proteina i DNA od denaturacije. Jedan od mehanizama je povećanje hidrofobnosti proteinske srži što povećava ionske interakcije na površini proteina. Povećava se gustoća pakiranja atoma i stvaraju se nove vodikove veze. Arhealni proteini sadrže visok udio valina, glutamina i lizina. Postoje i specifični arhealni šaperoni koji na vrlo visokim temperaturama smataju djelomično denaturirane proteine (Wiley i sur. 2011). Također, postoji nekoliko mehanizama za prevenciju denaturacije molekule DNA. Imaju „obrnutu“ DNA-girazu koja uvodi pozitivne, a ne negativne superzavoje. Pozitivni superzavoji pridonose većoj termostabilnosti DNA i pronađena je jedino u hipertermofila. Neki termofili imaju veću koncentraciju otopljenih tvari u citoplazmi što prevenira gubljenje purina i pirimidina na većim temperaturama. Prisutnost histona u arhealnoj DNA također doprinosi povećanoj termostabilnosti.

6. EKOLOGIJA ARHEJA

Arheje su fiziološki međusobno različite i naseljavaju širok spektar ekosustava. Zbog toga je uobičajena podijela na nekoliko fizioloških skupina: termofili, halofili, metanogeni, termoacidofili, sumporeducirajući, sulfatreducirajući i mezofili (Takacs i sur.2001).U sljedećim potpoglavljima te fiziološke skupine su smještene u odgovarajuće koljeno.

6.1. KOLJENO CRENOARCHAEOTA

U koljeno Crenarchaeota spada jedan razred *Thermoprotei* koji je podijeljeno na 4 reda i 6 obitelji. Red *Thermoproteales* sadrži dvije porodice, *Thermoproteaceae* i *Thermofiliaceae*. U *Thermoproteaceae* spadaju anaerobni i fakultativni hipertermofilni rodovi, a u *Thermofiliaceae* samo jedan predstavnik, *Thermophilum pedens*, anaerobni filamentozni termoacidofil. Članovi roda *Sulfobales* su termoacidofilni koki. Dvije obitelji unutar reda *Desulfurococcales* su diskoidalni ili koki hipertermofili. Rastu kemolitotrofno oksidirajući vodik ili organotropno fermentacijom ili respiracijom sa sumporom kao elektron-akceptorom. Članovi obitelji *Desulfurococcaceae* su također heterotrofi sa sumporom kao elektron-akceptorom. Ova obitelj sadrži rod *Ignicoccus*. Obitelj *Pyrodictiaceae* čine rodovi *Pyrodictium* i *Pyrolobus*. Red *Caldisphaerales* ima samo jedan rod, *Caldisphaera* čiji pripadnici su termoacidofilni, aerobni i heterotrofni koki (Forterre i sur. 2002).

Većina ovih termofila su ovisni o sumporu. Sumpor je ili elektron-akceptor u anaerobnoj respiraciji ili elektron-donor kod litotrofa. Mnogi su striktni anaerobi. Rastu u geotermalnim izvorima ili tlu koje sadrži sumpor. Jedno od takvih staništa je sumporom bogati termalni izvor u Yellowstone nacionalnom parku u Sjedinjenim američkim državama (Slika 6). Mnogi hipertermofili su nađeni u vodama koje okružuju podmorske vulkane zvane solfatare. Ove arheje su jako termofilne i zbog toga ih se naziva hipertermofilima. Najekstremniji primjerak je nađen u hidrotermalnom području u sjevernom Pacifiku i pripada rodu *Pyrodictiaceae*. Optimalna temperatura za rast je 105 °C, ali i autoklaviranje na 121 °C kroz 1h ga ne ubije. Vrsta je striktno anaerobna i upotrebljava Fe(III) kao terminalni akceptor elektrona i elementarni vodik ili format kao elektron-donor i izvor energije. (Wiley i sur. 2011)

Najbolje istraženi rodovi su *Sulfobales* i *Thermoproteus*. Pripadnici roda *Sulfobales* se boje Gram-negativno, aerobni su i sferični. Optimalna temperatura za rast im je oko 80 °C, a

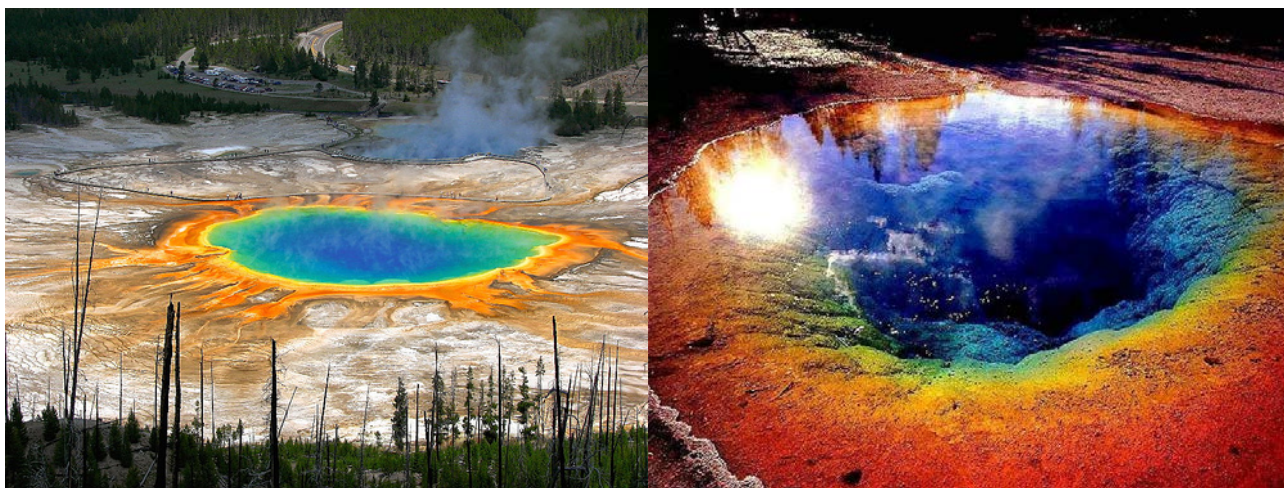
optimalna pH-vrijednost za rast je 2 – 3 što ih svrstava u termoacidofile. Stanična stijenka sadrži lipoproteine i ugljikohidrate. Rastu heterotrofno kada je kisik dostupan, a mogu i kemolitotrofno oksidirajući elementarni vodik, sumporovodik i željezov(III)sulfat s kisikom kao terminalnim akceptorom elektrona. Vrsta *S. solfataricus* raste u rasponu pH-vrijednosti od 2 – 4, a pH-vrijednost citoplazme održava na 6.5 i tako generira veliki pH-gradijent preko plazma-membrane. Ta energija je pohranjena u molekulama ATP-a na membranski vezanim ATP–sintazama i na petnaestak prijenosnih sustava koji združuju transport organskih tvari i protona. Prisutni su i ABC-transportni sustavi koji imaju visok afinitet za supstrat što ih čini veoma važnima za prehranu u okolišu s niskom razinom nutrijenata. Kada rastu heterotrofno, šećeri su oksidirani u nefosforilativnoj inačici Entner–Doudoroff puta i kroz ciklus limunske kiseline. Vrsta *S.solfataricus* ima NADP⁺ kao elektron-akceptor i feredoksin–ovisnu oksidoreduktazu.(Wiley i sur. 2011)

Članovi roda *Thermoproteus* imaju staničnu stijenku građenu od glikoproteina, anaerobi su i rastu pri temperaturama od 75 do 100 °C. Neke vrste su acidofilne i rastu pri pH-vrijednosti između 3 i 4, a neke vrste su neutrofili. Pronađeni su u vrućim izvorima i sličnim vrućim vodenim habitatima bogatim sumporom (Slika 5.). Mogu rasti organotrofno i oksidirati glukozu, aminokiseline, alkohole i organske kiseline s elementarnim sumporom kao elektron-akceptorom tijekom anaerobne respiracije. Također rastu kemolitotrofno, oksidirajući elementarni vodik s elementarnim sumporom kao elektron- akceptorom. Ugljikov dioksid može služiti kao izvor ugljika i inkorporira se reduktivnim ciklusom limunske kiseline.(Wiley i sur. 2011)

Morski Crenoeaeota, vrsta *Nitrosopumilus maritimus* vrši i nitrifikaciju.Prva je mezofilna arheja izolirana u čistoj kulturi i sekvenciranog genoma, a iznimno je česta u planktonu oceana (Walker i sur. 2010)



Slika 5. Geotermalni izvor (en.wikipedia.org)



Slika 6. Geotermalni izvor u Yellowstone nacionalnom parku, SAD (en.wikipedia.org)

6.2. KOLJENO EURYARCHAEOTA

Euryarchaeota je koljeno s mnogo rodova. Detaljno je opisano 5 najvećih fizioloških grupa.

6.2.1. METANOGENI

Metanogeneza je važna u sveukupnom ciklusu ugljika na Zemlji. Metan služi kao izvor ugljika mnogim heterotrofnim mikroorganizmima i otpušta se u atmosferu. Metanogeneza je zabilježena u širokom rasponu u raznim staništima, na hladnom i toplom, kiselom i alkaličnom te na područjima visokog saliniteta. Metanogene nalazimo u morskim i slatkovodnim sedimentima, močvarama, poplavljenim tlima, arktičkoj tundri, dubokomorskim termalnim izvorima i u animalnom gastrointestinalnom traktu. Metanogenezu inhibira pH-vrijednost ispod 5 pa ekstremni acidofilni metanogeni nisu nikada izolirani. Proizvodnja metana je rezultat tri različita puta: redukcija ugljikovog dioksida, metilotrofnog puta i acetilklastičnog puta. Također postoje i tri osnovne vrste metanogenog okoliša u kojima su važna ova tri puta. Jedan od metanogenih okoliša je u plitkom morskom sedimentu ili drugim staništima koji sadrže sulfate.

Postoji pet redova (*Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* i *Methanopyrales*) i 26 rodova koji se međusobno razlikuju po obliku, sekvenci gena za 16S rRNA, strukturi i kemiji stanične stijenke, membranskim lipidima i mnogim drugim karakteristikama. Zanimljivo je da metanogeni imaju nekoliko jedinstvenih kofaktora: tetrahidrometanopterin, metanofuran, koenzim M, koenzim F420 i koenzim F430.

Procijenjeno je da metanogene arheje godišnje proizvedu milijun tona metana. Metanogeneza može biti smatrana i ekološkim problemom. Metan apsorbira infracrveno zračenje, a atmosferska koncentracija metana je dosta narasla u zadnjih 200 godina. Proizvodnja metana može znatno doprinjeti rastu globalnog zatopljenja (Wiley i sur. 2011).



Slika 7. Mjehurići metana u močvari (en.wikipedia.org)

6.2.2. HALOBACTERIA

Ekstremni halofili iz reda *Halobacteriales* su još jedna velika grupa Euryarchaeota. Red sadrži 17 rodova iz jedne porodice *Halobacteriaceae*. Većina su aerobni kemoorganotrofi s respirarnim metabolizmom. Prvi halofili su izolirani iz usoljene ribe i trebali su kompleksne nutrijente za rast. Nedavno izolirani halofili najbolje rastu u definiranom mediju, upotrebljavajući ugljikohidrate ili jednostavne tvari kao glicerol, acetat ili piruvat kao izvor ugljika. Najizrazitija odlika pripadnika ove porodice je apsolutna ovisnost o koncentraciji natrijevog klorida. (Wiley i sur. 2011.). Ovi pripadnici koljena Euryarchaeota trebaju barem 1.5 M NaCl, a optimum rasta im je od 3 do 4 M NaCl. Rastu na koncentracijama soli koje su blizu zasićenja (36 %). Stanična stijenka im se raspada ako je koncentracija NaCl manja od 1.5 M. Zbog toga halobakterije nalazimo u okolišu zasićenom soli kao što su solane ili slana jezera kao Mrtvo more između Izraela i Jordana i *Great Salt Lake* u državi Utah, SAD. Halobakterije često imaju crveno ili žuto obojenje zbog karotinoidnih pigmenata koje koriste kao zaštitu od sunca, pa čak i daju crveno obojenje zasoljenoj ribi. Halofili se upotrebljavaju u proizvodnji razne usoljene hrane.

Halofili imaju dvije strategije za borbu s osmotskim stresom. Prvi način je povećanje osmolarnosti citoplazme akumulirajući male organske molekule - osmoprotektante kao npr. glicin, betain, poliol, ektoin i aminokiseline. Članovi reda *Halobacteriales*, *Haloanaerobiales* i *Salinibacter* imaju „salt – in“ pristup. Ove arheje imaju Na^+/H^+ -antiportere i K^+ -simportere

kako bi koncentracija KCl i NaCl u citoplazmi bila jednaka okolišnim koncentracijama. Zato proteini trebaju zaštitu od denaturacije i dehidracije. Proteini halofila imaju ograničen broj hidrofobnih aminokiselina i veći broj kiselih ostataka. Kisele aminokiseline nalaze se na površini proteina i tako privlače katione koji stvaraju zaštitni omotač oko proteina, održavajući topljivost. Najbolje istražen član obitelji je vrsta *Halobacterium salinarium*. Ova arheja je neobična jer ima protein bakteriorodopsin koji veže svjetlosnu energiju bez prisutnosti klorofila. Strukturno je sličan rodopsinu iz oka sisavaca, a funkcionalno je protonska pumpa. Kao svi proteini iz porodice rodopsina, bakteriorodopsin ima dvije važne karakteristike: kromofor, derivat retinala (aldehid vitamina A) kovalentno vezan na lizin proteina Schiffovom bazom i sedam domena koje se protežu kroz membranu. Molekule bakteriorodopsina tvore agregate u modificiranoj regiji plazma-membrane nazvane purpurna membrana. *Halobacterium* ima tri dodatna rodopsina, svaki sa posebnom funkcijom. Halorodopsin upotrebljava svjetlosnu energiju za transport kloridnih iona u stanicu za održavanje intracelularne koncentracije KCl – a. Druga dva rodopsina su senzorna i djeluju kao fotoreceptori, za plavu i crvenu boju.

Arheje roda *Halobacterium* imaju više vrsta ATP-transportera za unos kationskih aminokiselina, peptida i šećera. Ugljikohidrati se oksidiraju fosforilativnom verzijom Entner–Doudoroff puta i ciklusom limunske kiseline. Također su prisutni geni za iznošenje toksičnih teških metala arsena i kadmija.



Slika 8. Ružičasta boja soli u solanama dolazi od halofilnih arheja (en.wikipedia.org)

6.2.3. THERMOPLASMATA

Arheje iz razreda *Thermoplasmata* su termoacidofili koji nemaju staničnu stijenkku. Poznata su tri roda: *Thermoplasma*, *Picrophilus* i *Ferroplasma*. Zbog svojih različitosti svaki od njih čini zasebnu porodicu: *Thermoplasmataceae*, *Picrophiliaceae* i *Ferroplasmataceae*.

Pripadnici roda *Thermoplasma* rastu najbolje pri temperaturi od 55 – 59 °C i vrijednosti pH između 1 – 2. Zanimljivo je da se najčešće nalaze u rudnicima gdje se kopa pirit (FeS). Kemolitotrofne bakterije oksidiraju pirit u sumpornu kiselinu pa naslage stijena postanu vruće i kisele. Iako nemaju staničnu stijenkku, plazmatska membrana je pojačana diglicerol tetraeterom, liposaharidima i glikoproteinima. DNA je stabilizirana arhealnim histonima u strukturu sličnu eukariotskim nukleosomima.

Rod *Picrophilus* je izoliran iz umjereno vrućih solfatara u Japanu. Aeroban je i raste pri temperaturi između 47 i 65 °C. Raste pri pH-vrijednosti ispod 3.5, optimalno je pri 0.7. Može rasti čak i pri pH-vrijednosti 0 (Wiley i sur. 2011).



Slika 9. Prikaz rudnika piritu i kisele rijeke koju stvaraju arheje iz roda *Thermoplasma* (en.wikipedia.org)

6.2.4. SUMPOR–REDUCIRAJUĆI EKSTREMNI TERMOFILI

Ova fiziološka grupa sadrži razred *Thermococci* s jednim redom *Thermococcales*. Striktni su anaerobi i mogu reducirati sumpor u sulfid. Optimalna temperatura za rast im je između 88 i 100 °C. Red sadrži tri roda: *Thermococcus*, *Paleococcus* i *Pyrococcus*.

6.2.5. SULFAT – REDUCIRAJUĆI EURYARCHAEOTA

Sulfat–reducirajući Euryarchaeota su pronađeni u razredu *Archaeoglobi* i redu *Archaeoglobales*. Red *Archaeoglobales* sadrži jednu porodicu i tri roda.

Arheje roda *Archaeoglobus* se boje Gram–negativno, oblika je koka, a stijenka im se sastoji od glikoproteina. Primaju elektrone iz raznih elektron-donora (vodik, laktat, glukoza) i reduciraju sulfat, sulfit i tiosulfat u sulfid. Elementarni sumpor se ne koristi kao elektron-akceptor. Rod *Archaeoglobus* je termofilan s optimum rasta pri temperaturi od 83 °C i izoliran je iz morskih hidrotermalnih izvora. Neobično je što posjeduje metanogene koenzime F420 i metanopterin. Proizvodi male količine metana, ali nema kritični enzim metil – CoM reduktazu pa je mehanizam proizvodnje metana nejasan (Wiley i sur. 2011).

7. ZAKLJUČAK

Kada su prvi put otkrivene, arheje su smatrane bakterijama. Sekvenciranjem gena za ribosomsku podjedinicu 16S te filogenetskim analizama ustanovljeno je da pripadaju novoj vrsti prokariota sličnoj bakterijama i eukariotima. S obje skupine dijele razne karakteristike. Nekoć su ih nazivali arhebakterijama, a u novije vrijeme ih zovemo arhejama kako bi se istakla njihova odjeljenost od bakterija i posebnost njihovog superkraljevstva. Također su poznate kao ekstremofili jer naseljavaju ekstremne biotope, no danas znamo da postoje i arheje koje naseljavaju staništa umjerenih uvjeta za život, mezofilne arheje. Termofili žive na visokoj temperaturi, hipertermofili na jako visokoj temperaturi (zabilježeno 121 °C). Psihrofili najbolje rastu na hladnim mjestima poput Antarktike, halofili u jako slanim uvjetima poput Mrtvog mora. Acidofili rastu na područjima niskog pH, a alkalofili na područjima visokog pH. Mezofilne arheje nalazimo u oceanima i morima kao plankton te u morskim sedimentima. Postoje i nitrificirajuće mezofilne arheje.

Filogenetski se dijele na nekoliko koljena, a većina je svrstana u dvije najveće grupe: Euryarchaeota i Crenarchaeota. U Euryarchaeota svrstavamo metanogene, halofile i termoacidofile. Metanogeni su pronađeni u anaerobnim okolišima kao npr. u močvarama, rumenu preživača, ljudskom crijevu i probavnom sustavu termita. Oni su kemoautotrofi, koriste vodik kao izvor elektrona za reduciranje ugljikovog dioksida i proizvode metan. Halofili su nađeni u slanom okolišu kao što je Great Salt Lake u SAD – u i Mrtvo more. Održavaju osmotsku ravnotežu tako što nakupljaju kompatibilne osmolite u svojoj citoplazmi. Termoacidofili su pronađeni u vrućem i kiselom okolišu kao što su sumporni izvori u Yellowstone nacionalnom parku i podmorskim vrelima.

Prvi pronađeni članovi koljena Crenarchaeota su hipertermofili. Optimalna temperatura za rast im je 121°C, ista temperatura na kojoj se sterilizira laboratorijsko posuđe i hranjivi mediji u autoklavu. Ostali članovi koljena Crenarchaeota su pripadnici planktona u hladnim morskim vodama i mikrobi u tlu i oceanu koji pretvaraju amonijak u nitrat.

Evolucijski, arheje dijele mnoge karakteristike s bakterijama i eukariotima, ukratko prikazane u tablici 1.

Tablica 1. Karakteristike koje arheje dijele s eukariotima i prokariotima (en.wikipedia.org)

Eukariotske značajke	Bakterijske značajke
<ul style="list-style-type: none"> • replikacijske mašinerija • histoni • struktura slična nukleosomu • transkripcijska mašinerija <ul style="list-style-type: none"> ○ RNA-polimeraze ○ TFIIB ○ <i>TATA-binding protein</i> (TBP) • translacijska mašinerija <ul style="list-style-type: none"> ○ inicijacijski faktori ○ ribosomski proteini ○ elongacijski faktori ○ osjetljivost na toksin difterije 	<ul style="list-style-type: none"> • kružni kromosom • operoni • odsustvo introna • bakterijski membranski kanali • razni metabolički procesi <ul style="list-style-type: none"> ○ proizvodnja energije ○ fiksacija dušika ○ sinteza polisaharida

Arheje su osim svojom iznimnom kompleksnošću, zanimljive i zbog ekonomske važnosti. Jedno od najvećih preokreta u molekularnoj biologiji je bio pronalazak metode PCR u kojoj je od iznimne važnosti termostabilna DNA polimeraza iz arheje *Thermus aquaticus* koja replicira DNA na visokim temperaturama i omogućuje umnažanje molekule u velikom broju kopija (science.howstuffworks.com). Također postoji primjena i arhealnih enzima koji zadržavaju svoju aktivnost pri visokim temperaturama u deterdžentima i onih enzima koji pretvaraju kukuruzni škrob u dekstrine (science.howstuffworks.com). Arheje se također razmatraju kao opcija pri čišćenju kontaminiranih mjesta kao što su naftne mrlje.

8. LITERATURA

Patrick Forterre, Celine Brochier, Herve Philippe (2002) Evolution of the Archaea, *Theor Popul Biol* **61**, 409–422

Simonetta Gribaldo, Celine Brochier-Armanet (2006) The origin and evolution of Archaea: a state of the art, *Phil. Trans. R. Soc. B.* **361**, 1007–1022

Gupta RS (1998.) Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of revolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria and eukaryotes, *Microbial Mol Biol Rev*, **62**:1435 – 1491

Ken F. Jarrell, Alison D. Walters, Chitvan Bochiwal, Juliet M. Borgia, Thomas Dickinson, James P. J. Chong (2011) Major players on the microbial stage: why archaea are important, *Microbiology*, **157**, 919–936

Lake JA, Servin JA Herbold CW, Skophammer RG (2008.) Evidence for a new root of the tree of life, *Syst biol*, **57**:835 – 843

Cristina D Takacs, Anna-Louise Reysenbach, David R Boone (2001) Archaeal ecology, *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / & 2001 Nature Publishing Group / www.els.net*

Ruben E Valas, Philip E Bourne (2011) The origin of a derived superkingdom: how a gram-positive bacterium crossed the desert to become an archaeon, *Valas and Bourne Biology Direct*, **6**:16

Wiley JM, Sherwood LM, Woolverton CJ (2011) Prescott's Microbiology 8th Edition, Ed. M. Lange, McGraw – Hill Companies, New York, NY

<http://en.wikipedia.org/>

9.SAŽETAK

Kada su prvi puta pronađeni 1977.godine, arheje, ovi mikroskopski jednostanični organizmi su klasificirani kao bakterije. Kasnije genetičke i biokemijske analize pokazale su da su arheje srodnije eukariotima. Istraživači koji su to otkrili, Woese i suradnici su predložili da se uvrste u novu domenu što je taksonomski razina iznad kraljevstva i tada je cijeli živi svijet re-klasificiran u tri domene: bakterije, eukarioti i arheje. Opisano je oko 250 vrsta arheja i većina ih je svrstana u dva koljena: Euryarchaeota i Crenarchaeota. Mnoge od njih žive u ekstremnim uvjetima, na mjestima za koje smo mislili da život tamo ne može postojati, a također postoje i arheje umjerenih staništa, mezofilne arheje. Zbog arhealnih enzima koji funkcioniraju na visokim temperaturama vrše se intenzivna istraživanja arheja za komercijalne svrhe kao npr. izolacija enzima koji bi se dodali u detergente i enzimi koji pretvaraju kukuruzni škrob u dekstrine. Arheje također mogu doprinjeti čišćenju kontaminiranih mjesta kao na primjer naftne mrlje u oceanima.

10.SUMMARY

When first discovered in 1977, archaea, these microscopic single-celled organisms were classified as Bacteria. However, later genetic and biochemical analyses showed that they were more closely related to the Eukaryotes. The researchers who discovered this, Woese and his colleagues, proposed the addition of the “domain” as a taxonomic level above that of kingdom, with all life classified within one of three domains, now called Bacteria, Eukaryotes, and Archaea. More than 250 species of Archaea had been described, most fitting into one of two phyla, Euryarchaeota and Crenarchaeota. Many of these live in extreme environments – places where we once believed no life could exist, but there are also the archaea which live in moderate environments, mesophilic archaea. Because they have enzymes that can function at high temperatures, considerable effort is being made to exploit the archaea for commercial processes such as providing enzymes to be added to detergents (maintain their activity at high temperatures and pH) and an enzymes to covert corn starch into dextrans. Archaea may also be enlisted to aid in cleaning up contaminated sites, e.g., petroleum spills.